



## Artículo Original

# Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada

Effect of *Origanum vulgare* essential oil on survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella paratyphi* and *Salmonella enteritidis* in pasteurized and refrigerated meat pork

María Vásquez Valles, Pedro Alvarado Salinas, Icela Rodríguez Haro, Wilton Saldaña Sevilla, Wilson Reyes Lázaro y Araceli Vargas Huamán  
Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

## RESUMEN

La protección de alimentos de microorganismos patógenos se hace mayormente con sustancias químicas, muchas de ellas de elevada toxicidad y dañinas para el medio ambiente, ante ello se está investigando sustancias de origen natural que tengan la misma actividad. En la presente investigación se determinó el efecto del aceite esencial del orégano, *Origanum vulgare* (AEOV), en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada con la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del AEOV para cada una de las bacterias en estudio. El vegetal procedió de la zona de San Ignacio Provincia de Otuzco (La Libertad, Perú) y el aceite esencial se obtuvo mediante el método de Destilación directa por arrastre con vapor de agua; posteriormente, se determinó la CMI mediante el método de Macrodilución en caldo nutritivo más Tween 80 al 0.1% para cada microorganismo. Las CMI fueron: para *S. typhi*, 3.0 µL/mL; *S. enteritidis*, 1.7 µL/mL; *S. paratyphi* A, 2.3 µL/mL y *S. aureus*, 1.5 µL/mL. Cada una de las CMI se inocularon en sistemas de ensayo conteniendo 10 g carne de porcino molida y pasteurizada a 80°C±1°C durante 30 minutos y 1 mL de suspensión bacteriana y se llevaron a refrigeración a 8°C±1°C durante 192 horas, al término de los cuales se realizó la medición del crecimiento microbiano mediante la técnica de recuento en placa en Agar Müller Hinton. Se concluye que: (i) las CMI del AEOV afectan la supervivencia de *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A y *S. aureus*, (ii) AEOV que suplementa a la carne molida de cerdo afecta de manera diferente la supervivencia de las especies de bacterias probadas y (iii) AEOV que suplementa a la carne molida de cerdo afecta en mayor medida a *S. aureus* y en menor medida a *S. typhi*.

**Palabras clave:** Supervivencia, *Origanum vulgare*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, concentración inhibitoria mínima

## ABSTRACT

Protecting food pathogens is mostly with chemicals, many of them highly toxic and harmful to the environment, before it is being investigated naturally occurring substances that have the same activity. In the present investigation the effect of the essential oil of oregano, *Origanum vulgare* (AEOV), on the survival of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* and *Salmonella enteritidis* was determined in pasteurized pork meat and chilled with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) the AEOV for each of the bacteria studied. The plant came from the San Ignacio Otuzco province (La Libertad, Peru) and the essential oil was obtained by the method of

direct distillation by steam stripping; subsequently, the MIC was determined by the method in nutrient broth macrodilution most 0.1% Tween 80 for each microorganism. The MICs were: for *S. typhi*, 3.0 uL/mL; *S. enteritidis*, 1.7 uL/mL; *S. paratyphi* A, 2.3 uL/mL and *S. aureus*, 1.5 uL/mL. CMI each inoculated test systems containing 10 g ground beef and pork pasteurized at  $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes and 1 ml of bacterial suspension and cooling took  $8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 192 hours, after which the measurement of microbial growth was performed by the counting technique Muler Hinton Agar plate. We conclude that: (i) the MIC of AEOV affect the survival of *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A and *S. aureus*, (ii) that supplements AEOV ground pork differently affect survival species of bacteria tested and (iii) that supplements AEOV ground pork affects more to *S. aureus* and to a lesser extent *S. typhi*.

**Keywords:** survival, *Origanum vulgare*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, Minimum Inhibitory Concentration

## INTRODUCCIÓN

La conservación de los alimentos ha experimentado un cambio complejo debido a una continua búsqueda de nuevos alimentos con una vida media estable larga y alta protección contra la actividad microbiana, es decir, alimentos naturales caracterizados por estar libres o poseer bajos niveles de aditivos químicos, bajo impacto sobre el medio ambiente e inocuos; esto ha impulsado a la búsqueda de componentes antimicrobianos naturales para reemplazar a los químicos convencionales<sup>1,2</sup>.

Más de 1340 plantas son conocidas como fuentes potenciales de compuestos antimicrobianos; sin embargo, pocos de ellos han sido estudiados científicamente<sup>3</sup>. Los extractos de estas plantas han sido considerados como antibacterianos naturales de alimentos y pueden ser usados como métodos adicionales para el control del crecimiento y supervivencia de microorganismos alteradores y patógenos<sup>4,5,6,7</sup>.

El ajo, la cebolla, la menta, el anís, la albahaca, el cilantro, la canela, y el orégano han sido usados primeramente como flavorizantes y posteriormente reconocidos por su potencial antimicrobiano<sup>8</sup>. Dentro de ellas destaca el orégano por su uso como antiespasmódico, antifúngico, anticoccidial y antibacteriano, gracias a la presencia en sus hojas de p-cimeno y los derivados fenólicos carvacrol y timol<sup>6,9</sup>.

Al mismo tiempo, géneros como *Salmonella* y *Staphylococcus* pueden contaminar los alimentos y ser agentes causales de enfermedad. Las salmonelas son reconocidas como las principales responsables de casos y brotes de infecciones alimentarias debido, entre otras razones, a las malas prácticas intensivas en producción animal y a la globalización del comercio de alimentos<sup>10,11</sup>. Los serotipos más importantes desde el punto de vista de la Salud Pública son *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, que se adquieren por consumo de huevos y de carne de vacuno y porcino, respectivamente<sup>10</sup>. En Brasil, se observó que una de las fuentes de contaminación de *S. entérica* más significativa en una granja porcina eran los corrales de mantenimiento; en los EEUU se examinaron 8066 muestras y se detectaron salmonelas en 83 cerdos, 54 en suelos de los corrales, 32 en las botas de los operarios, 16 en moscas, 9 en ratones, 3 en gatos y 9 en pájaros<sup>12</sup>.

*Staphylococcus aureus*, por su parte, es vehiculizado especialmente por productos cárnicos y debe su patogenicidad a la producción de diversas exoenzimas tales como la coagulasa, hemolisina, proteasa, lipasa y enterotoxina, en un rango de temperatura de 7 a 48°C<sup>13</sup>. La intoxicación producida por esta bacteria es una de las más ampliamente distribuidas y constituye un considerable problema social, en términos de estancia en los hospitales, pérdida de días de trabajo y productividad, conjuntamente con el costo de la disposición del alimento contaminado<sup>14</sup>.

Se ha investigado el uso de químicos tales como el sorbato de potasio, sorbato y antioxidantes en combinación con otros químicos como inhibidores del crecimiento de *S. aureus*; sin embargo, los consumidores a nivel mundial se han sensibilizado a la no presencia de químicos en los alimentos, de modo que los científicos y tecnólogos alimentarios, tienen gran interés en el uso de sustancias inhibitorias naturales para prevenir el crecimiento de organismos productores de toxinas en los alimentos<sup>15</sup>.

Desde el punto de vista microbiológico el contenido en agua de la carne es alto y su aw de 0,99 lo que favorece el crecimiento de microorganismos como *Salmonella* y *Staphylococcus*, los cuales al satisfacer

sus necesidades nutritivas, modifican la composición de la carne y pueden ser fuente de enfermedad para los consumidores<sup>16,17</sup>.

Investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de mostaza, clavo, menta y canela han demostrado ser activos contra bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, levaduras y mohos<sup>2,5</sup>. En el mismo sentido, se encontró que el aceite esencial del orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas, a la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 1.56%<sup>18,19</sup>, gracias a que contiene limonene, el gamma-cariofilene, rho-cymenene, alcanfor, linalol. Alpha-pinene, carvacrol y thymol<sup>2,20</sup>.

Teniendo en cuenta que: (i) la carne de cerdo es muy usada en la preparación de diferentes platos y que sirve como materia prima para la preparación de derivados cárnicos, principalmente embutidos, por lo que son susceptibles de contaminarse por patógenos como *Salmonella* y *Staphylococcus*, (ii) las carnes procesadas tienen conservadores químicos pero que es preferible que los tengan naturales que les provean de sabores y olores deseados y (iii) el orégano presenta comprobadas actividades antimicrobianas<sup>21</sup> es que se realizó la presente investigación que tuvo como objetivo determinar el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

#### a. Cultivos de:

- *S. aureus* coagulasa positivo aislado en el laboratorio de Microbiología y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Trujillo (LAMTAUNT), Trujillo, Perú, a partir de embutido.
- *S. thypi*, *S. enteritidis*, proporcionado por el Laboratorio Referencial del Hospital Belén de Trujillo
- *Salmonella parathypi* A proporcionado por el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

#### b. Hojas de *Origanum vulgare*, procedentes de la zona de San Ignacio Provincia de Otuzco Departamento de La Libertad (Perú).

#### c. Carne de cerdo fresca parte pierna, obtenida en el mercado de Monserrate de la ciudad de Trujillo, proveniente del Camal Municipal del Distrito el Porvenir.

### Recolección y transporte de las hojas de *Origanum vulgare*.

Las plantas de orégano fueron recolectadas intactas y adecuadas en tablas de material botánico para su transporte al Herbario Truxillense para su identificación y luego al Laboratorio de Química Física de la Facultad de Química de la Universidad Nacional de Trujillo para su procesamiento.

### Extracción del aceite esencial:

Se utilizó el Método de Destilación directa por arrastre con vapor de agua, cuyos pasos fundamentales fueron:

- Las plantas de orégano fueron lavadas con agua destilada y secadas en la estufa a 60°C por 2 días, posteriormente se eliminaron los tallos.
- Las hojas secas fueron trituradas hasta obtener partículas de menor tamaño.
- El orégano fue puesto en un balón de destilación de 3 L de capacidad el cual estuvo conectado a un generador de vapor consistente en un balón conteniendo 2 litros de agua .
- Se calentó el generador de vapor de tal forma que el vapor pasó a través de la muestra y del condensador por 2 horas.
- Se colectó la fracción acuosa y el aceite esencial en una pera de decantación.
- Se eliminó la fracción acuosa de la pera de decantación y se recolectó el aceite en un vial estéril de color ámbar.
- Se deshidrató el aceite de orégano con cloruro de calcio y se almacenó para su conservación en refrigeración a temperatura de 8±1 °C, hasta su posterior utilización.

### Preparación y estandarización del inóculo de los microorganismos en estudio

Cada uno de los cuatro cultivos a ensayar se sembraron en agar nutritivo y se incubaron durante 18 horas a 37°C. A partir de los cultivos se realizó una suspensión bacteriana hasta obtener una turbidez semejante al tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland ( $3 \times 10^8$  UFC/mL). Esta suspensión se denominó inóculo.

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):

Se determinó mediante el Método de macrodilución en caldo. Se prepararon tubos con un volumen final de 5 mL de caldo nutritivo más Tween 80 al 0.1% (V/V) a los que se les adicionó el volumen necesario de aceite de orégano hasta alcanzar las concentraciones de 0.00 (control), 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3.....2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5  $\mu$ L/mL en cada tubo. A cada uno de los tubos del ensayo se les adicionó una alícuota de 20  $\mu$ L de la suspensión bacteriana semejante al tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland y se homogenizó suavemente. Se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. A partir de los tubos que no presentaron desarrollo visible se sembró mediante la técnica por incorporación, 1 mL en agar Müller Hinton. Se consideró como CMI aquel tubo de menor concentración donde no hubo desarrollo bacteriano en las placas sembradas. Se realizó un tubo control para cada una de las bacterias ensayadas con tween 80 al 0.1%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Sistema de ensayo con carne de porcino molida.

- Se molió la carne de cerdo en una máquina moledora, se transfirió 10 g de carne molida a cada uno de los 32 frascos de vidrio estériles.
- Cada uno de los frascos se pasteurizó a 80°C por 30 minutos. Posteriormente se adicionó el aceite esencial de orégano a las CMB establecidas para cada microorganismo.
- Todos los frascos se inocularon con 1 mL de la suspensión bacteriana correspondiente al tubo N°1 del Nefelómetro de Mc Farland y se homogenizaron.
- Cada uno de los sistemas de ensayo se almacenaron a refrigeración a  $8^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  y se procesaron a partir de las 0 horas cada 24 horas hasta un periodo de 192 horas.
- Se realizó un control con carne molida y orégano a las concentraciones indicadas y 1 mL de agua lo cual constituyó el control de la pasteurización
- Todos los ensayos se realizaron por triplicado

### Medición del crecimiento bacteriano del sistema de carne de porcino molida.

A los frascos de vidrio conteniendo 10 g de carne de cerdo molida, *O. vulgare* y el cultivo bacteriano respectivo, se les adicionó 90 mL de SSFE mas Tween 80 al 0.1%, la cual constituyó la primera dilución ( $10^{-1}$ ). Se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se realizaron diluciones consecutivas con cada una de las bacterias en estudio, de acuerdo al siguiente esquema:

MICROORGANISMO	TIEMPO (hs)	DILUCIONES
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	$10^{-7}$ , $10^{-8}$ , $10^{-9}$
	24	$10^{-6}$ , $10^{-7}$ , $10^{-8}$
	48	$10^{-6}$ , $10^{-7}$ , $10^{-8}$
	72	$10^{-5}$ , $10^{-6}$ , $10^{-7}$ ,
	96	$10^{-4}$ , $10^{-5}$ , $10^{-6}$ ,
	120	$10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$
	144	$10^{-3}$ , $10^{-4}$ , $10^{-5}$
	168	$10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$
	192	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$

Las dos últimas diluciones de cada sistema se sembraron por incorporación en Agar Müller Hinton y se incubaron a 37°C por 24 horas. Cada una de las concentraciones de orégano determinadas como CMI, para cada microorganismo ensayado si hicieron de acuerdo al mismo procedimiento. Los resultados fueron expresados en log UFC/g de carne. Todos los sistemas ensayados se realizaron por triplicado.

### Análisis de los resultados

Los datos obtenidos de los recuentos de todos los sistemas y cultivos microbianos procesados fueron sometidos a la prueba de varianza Unidireccional (ANOVA) seguida por la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas de cada sistema experimental en relación al grupo control.

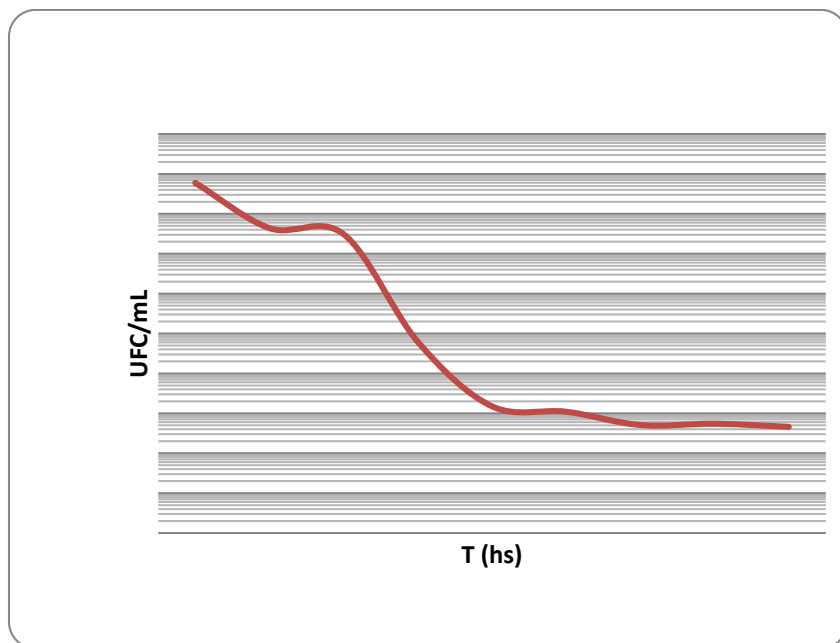
## RESULTADOS

Se encontró que la menor CMI para los diferentes microbios estudiados (*S. paratyphi* A, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *Staphylococcus aureus*) fue de 1.5  $\mu\text{L/mL}$  y la mayor de 3.0  $\mu\text{L/mL}$  de medio de cultivo (Tabla 1).

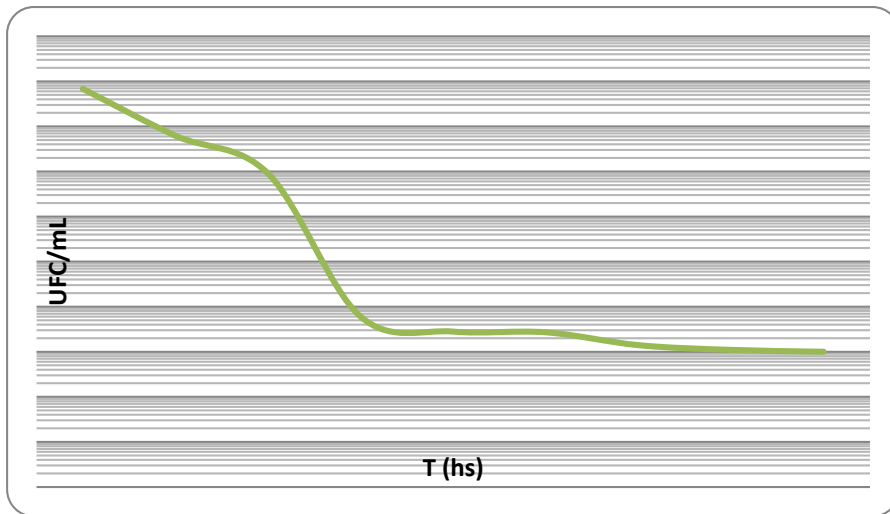
Respecto de la curva de supervivencia de los microorganismos en carne molida de cerdo a CMI variables y a tiempos también variables se apreció que hay una disminución significativa del número de microorganismos inoculados (Figs. 1, 2, 3 y 4); en cambio en todos después de las 144 hs los microorganismos se mantienen constantes (Fig. 5).

**Tabla 1.** Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre cuatro especies de bacterias

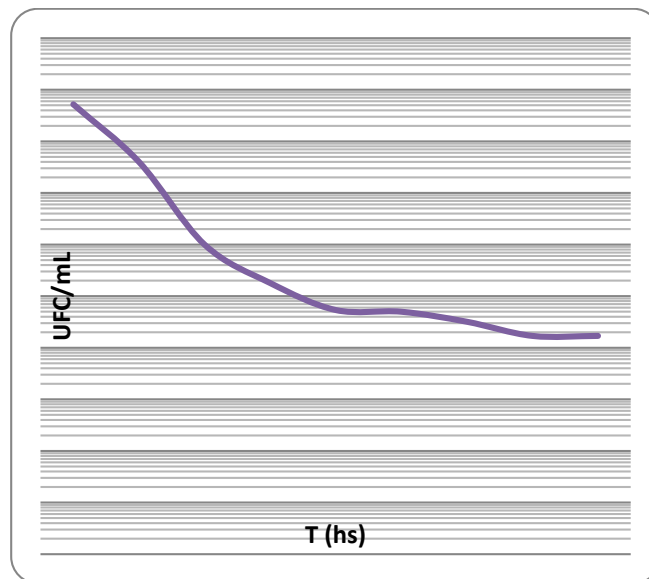
Especie de bacteria	CMI $\mu\text{L/mL}$
<i>Salmonella paratiphy</i> A	2.3
<i>Salmonella tiphy</i>	3.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.5



**Fig. 1.** Curva de supervivencia de *Salmonella Typhi* de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementada con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 3.0  $\mu\text{L/g}$



**Fig. 2.** Curva de supervivencia de *Salmonella paratyphi* A de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementado con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 2.3 µL/g



**Fig. 3.** Curva de supervivencia de *Salmonella enteritidis* de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementada con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 1.7 µL/g

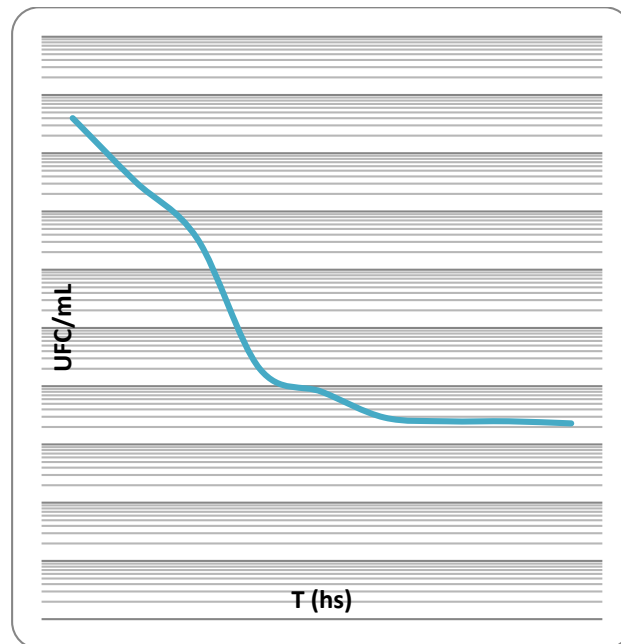


Fig. 4. Curva de supervivencia de *Staphylococcus aureus* de 0 hs a 192 hs en carne de cerdo suplementado con aceite esencial de *Origanum vulgare* a una CMI de 1.5 µL/g

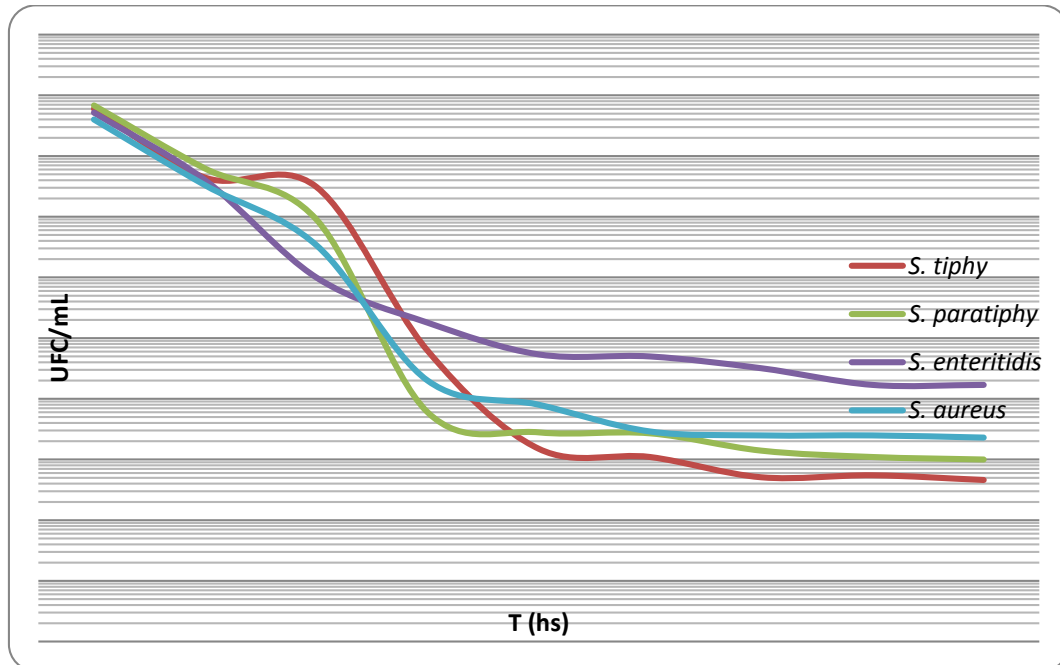


Fig. 5. Curvas de supervivencia de *S. typhi* (CMI: 3.0 µL/g), *S. paratyphi A* (CMI: 2.3 µL/g), *S. enteritidis* (CMI: 1.7 µL/g), *Staphylococcus aureus* (CMI: 3.0 µL/g) de 0 a 192 hs en carne de cerdo suplementado con aceite esencial de *Origanum vulgare*

## DISCUSIÓN

El orégano, ha sido una fuente invalorable de productos naturales para mantener la salud humana por un largo periodo de tiempo. Especialmente en la última década con estudios intensivos para terapias naturales. Como planta medicinal, el aceite volátil de orégano ha sido usado como antifúngico, antiespasmolítico y antimicrobiano<sup>9</sup>.

La coexistencia de *S. aureus*- *Salmonella*, en alimentos vinculados a ETA, se explica por la naturaleza de los alimentos, en su mayoría de origen animal, lo que justifica la presencia de ambos microbios, fundamentalmente de la enterobacteria; por otro lado, la presencia de dichos microbios, se debe a errores en la manipulación y conservación de los alimentos, aspecto comprobado en otras investigaciones<sup>22,23,24</sup>.

A pesar de que en la actualidad se ha mejorado la higiene y las técnicas de producción de alimentos, la seguridad alimentaria es un importante problema de salud pública. Se ha estimado que cerca del 30% de personas en países industrializados, cada año sufren de enfermedades transmitidas por alimentos y, en el 2000, al menos 2 millones de personas murieron de enfermedades diarreicas en todo el mundo<sup>25</sup>.

*S. aureus*, agente causal de intoxicación alimentaria cuando crece sobre alimentos frescos, cocidos o inadecuadamente almacenados, prevalece tanto en países desarrollados como en aquellos en vía de desarrollo. En países tropicales en desarrollo, este problema puede ser aún más crítico debido a que la carne fresca, otros productos animales y, alimentos preparados, son vendidos en mercados abiertos donde ellos están expuestos a un ambiente que conduce a la contaminación. En esas regiones, la refrigeración no es fácilmente disponible para los grupos económicos más bajos de modo que, los alimentos preparados, se dejan en lugares tibios por horas y aún días. Esto ocurre tanto en las casas como en tiendas y otros sitios de venta, aún en países altamente desarrollados del mundo. La intoxicación alimentaria por *Staphylococcus*, puede ocurrir debido a que el alimento preparado fue dejado sin refrigeración por un periodo largo antes de su consumo. Esto puede ocurrir en bufets, recepciones matrimoniales y otras festividades grupales. Alimentos como sándwiches, piernas, otras carnes, etc, son ricos en sustancias nutritivas y, siendo apropiada la temperatura a la cual se encuentran, ayudaría rápidamente al crecimiento y consecuentemente a la producción de la toxina estafilocócica<sup>15</sup>.

La efectividad de los agentes antibacterianos como el aceite esencial de orégano sobre microorganismos diana, son obtenidas a partir de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI). La CMI mide el desempeño antibacteriano del agente, a través de la más baja concentración de una droga que previene el crecimiento de un patógeno particular. La CMB es la concentración más baja que mata al patógeno<sup>26</sup>.

La menor CMI para los diferentes microbios estudiados fue de 1.5  $\mu\text{L/mL}$  para *S. aureus* y la mayor de 3.0  $\mu\text{L/mL}$  para *S. typhi*; con lo cual estadísticamente se observa una diferencia significativa entre la CMI de *S. typhi* (3.0  $\mu\text{L/mL}$ ) y *S. enteritidis* (1.7  $\mu\text{L/mL}$ ). Este resultado es interesante porque, a pesar de ser el mismo género bacteriano, se observa que *S. typhi* presenta mayor resistencia al aceite esencial de orégano por lo cual necesita mayores dosis del agente antibacteriano para inhibir su crecimiento. La acción inhibitoria encontrada, concuerda con lo hallado en investigaciones con *S. enteritidis* y aceite esencial de orégano encontraron CMI de 40  $\mu\text{L/mL}$ , y CMI para *St. aureus* de 20  $\mu\text{L/mL}$  de medio de cultivo<sup>2</sup>. El aceite esencial de orégano al actuar como antibacteriano afecta la permeabilidad de la membrana bacteriana causando un flujo de salida de iones desde el interior de la célula hacia el exterior. La salida de iones es usualmente acompañada con otros constituyentes citoplasmáticos, y hasta una cierta cantidad de pérdida puede ser tolerada por la célula bacteriana sin perder la viabilidad, pero si el flujo de salida es muy prolongado, causaría el colapso de la célula<sup>27</sup>.

Se puede decir que la actividad antimicrobiana del aceite esencial del orégano se relaciona con la composición de sus constituyentes, así, la composición del orégano en forma porcentual es: carvacrol 80%, thymol 64%  $\gamma$ -terpinenene 2-52% y p-cymene 82% ya que dicha composición puede variar en función del grupo funcional y las posibles acciones sinérgicas entre sus componentes<sup>2</sup>; por ejemplo, cuando se probó contra *S. aureus* y usando la técnica de difusión en agar se encontró un halo de 17.6



mm, mientras que enfrentándolo con uno de sus componentes, el carvacrol, encuentra un halo de inhibición de crecimiento de 11.3 mm, lo que significaría que este componente de manera aislada no tiene mucha actividad antibacteriana que estando en el aceite en forma sinérgica con el resto de componentes<sup>8</sup>.

Cuando se estudió el efecto antibacteriano del orégano contra bacilos Gram negativos y evaluándolos mediante la técnica de difusión en agar se encontró la CMI para *S. typhi* de 22.4  $\mu\text{mL}^{-1}$  y de 12  $\mu\text{mL}^{-1}$  para *S. paratyphi* B<sup>28</sup>; en tanto que cuando se trabajó con un inóculo de  $1 \times 10^6$  microorganismos/mL y adicionando 10  $\mu\text{L}$  de aceite de *O. vulgare* encuentra halos de inhibición de crecimiento de 32 mm para *S. aureus* y de 11 mm para *Salmonella*<sup>29</sup>. A pesar de ser dos técnicas diferentes, lo encontrado en el presente trabajo guarda relación con la CMI para *S. typhi* y *S. paratyphi* A por ser serotipos muy relacionados.

La supervivencia de *S. enteritidis* en carne molida de cerdo a CMI de 1.7  $\mu\text{L/g}$  con disminución significativa del número de microorganismos inoculados hasta las 96 hs y a partir de ésta el número de células se mantiene, estaría relacionado con el hecho de que los microorganismos como *S. enteritidis* al estar en un sistema con otros componentes como es la carne de cerdo puede interferir en la acción antibacteriana y crear mayor resistencia a la acción del aceite<sup>11</sup>. Lo mismo se apreció en la supervivencia de *S. aureus* en carne de cerdo molida y pasteurizada en la que se tiene una CMI de 1.5  $\mu\text{L/g}$  que es la más baja CMI encontrada, observándose que, hasta las 96 hs, hay una disminución significativa del número de microorganismos inoculados y hasta las 192 hs se mantiene constante, podría deberse a que cada aceite esencial tiene un diferente comportamiento al actuar sobre un microorganismo diana.

Por su parte, la curva de supervivencia de *S. aureus*, *S. typhi*, *S. enteritidis*, *S. paratyphi* A en carne molida de cerdo a diferentes CMI de aceite esencial de orégano, observándose que en todos después de las 144 hs los microorganismos se mantienen constantes, podría significar que el aceite solo es un agente bacteriostático; sin embargo, se ha reportado que las propiedades antimicrobianas pueden variar dentro de una misma especie de planta, debido a su composición química y proporciones relativas de los constituyentes individuales en los aceites esenciales de las plantas son por el genotipo, estado de crecimiento, clima, y localización geográfica<sup>29</sup>, estación, periodo de cosecha y técnica de destilación (Baydar *et al*, 2004). La actividad antibacteriana depende del tipo, concentración de la especie o el aceite esencial, el tipo y concentración del microorganismo blanco, la composición del sustrato, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento<sup>2</sup>.

Investigadores han adaptado métodos experimentales para representar lo mejor posible futuras aplicaciones, sin embargo el ensayo puede ser afectado por múltiples factores tales como: el método para extraer el material de la planta, el volumen de inóculo, la fase de crecimiento, el medio de cultivo, el pH, el emulsificante, el tiempo y la temperatura de incubación (Bruneton, 1999), es por eso que en numerosas investigaciones realizadas con el aceite esencial de *O. vulgare* se reportan diferentes hallazgos relacionados con la actividad antibacteriana del aceite. Es así que se han reportado la actividad del extracto etanólico de *Eleutherine americana* sobre *S. aureus* usando la técnica de difusión en agar obteniendo zonas de inhibición de 14.5 y 15.7 mm<sup>14</sup> y que cuando se trabaja con bacterias alteradoras y patógenos se detectó una MIC de 1.6  $\mu\text{L/mL}$  de aceite de orégano para *S. enteritidis*<sup>2</sup>.

El uso de agentes microbiostáticos en los alimentos, induce a la aparición de variantes resistentes de los microorganismos, la cual puede deberse a: (i) desarrollo de vías metabólicas alternativas a las bloqueadas por el agente antimicrobiano, (ii) se pueden sintetizar enzimas específicos para modificar la estructura y por tanto, inactivar al agente antimicrobiano o (iii) el microorganismo puede adquirir una resistencia más elevada por modificar su estructura<sup>11</sup>.

Las especias además de añadir flavor a los alimentos inhiben también el desarrollo de los microorganismos. En general, los organismos Gram positivos son más sensibles que los Gram negativos. La canela, el clavo y la mostaza están considerados como inhibidores fuertes, la pimienta negra, pimienta roja y el jengibre son inhibidores débiles para muchos microorganismos. La hoja de laurel, cilantro, cominos, orégano, romero, salvia y tomillo son inhibidores medios<sup>30</sup>. El orégano en un primer momento es bactericida para posteriormente actuar como un bacteriostático, sin embargo hay que resaltar que *S. enteritidis* a la CMI del antibacteriano tiene la mayor población hasta las 192 hs y *Salmonella typhi* tiene la menor población bacteriana. La prueba estadística usada soporta estos resultados.

La acción del aceite esencial de orégano sobre la supervivencia de los microorganismos ensayados podría deberse a la inserción de carvacrol en la membrana la que conduce a una disminución del potencial de membrana, tal como se demostró al evaluar la acción del carvacrol sobre el potencial de membrana de *B. cereus* apreciándose una disminución del pool de ATP intracelular<sup>31</sup>; el cymene, otro constituyente del orégano tal como el carvacrol, disminuye el potencial de membrana sin embargo carece del grupo hidroxilo, se necesitan concentraciones más altas de cimenol para obtener la misma reducción que la obtenida con el carvacrol. Sin embargo, el grupo hidroxilo juega un rol importante en el efecto del carvacrol sobre el potencial de membrana. El cimenol ejerce influencia en el pH intracelular debido a que expande la membrana citoplásmica causando una baja en el potencial de membrana.

El grupo hidroxilo de la molécula del carvacrol. Las observaciones descritas soportan el siguiente modelo de la acción antimicrobiana de una característica del grupo fenol hidroxilo es su significativa mayor acidez que la del grupo alifático hidroxilo. Se ha propuesto que el carvacrol actúa como un transportador de cationes monovalentes a través de la membrana por intercambiar su protón del grupo hidroxilo por otro ión tal como el ión potasio; en efecto, el carvacrol sin disociar difunde a través de la membrana citoplásmica y en el interior libera el protón al citoplasma. Este podría entonces retornar sin disociarse transportando un ión Potasio u otro catión del citoplasma el cual es transportado a través de la membrana citoplásmica al exterior de la célula; esta hipótesis es sostenida por el flujo de salida de K<sup>+</sup> y flujo de entrada del H<sup>+</sup> en *B. cereus* durante la exposición al carvacrol<sup>31</sup>.

Todos los cultivos ensayados en el sistema con carne de porcino molida y almacenada a temperatura de refrigeración, mostraron sensibilidad moderada frente al aceite esencial de orégano ya que, a pesar de haber causado una reducción drástica de la población bacteriana, los recuentos muestran la supervivencia de los diferentes microorganismos evaluados en la carne inoculada en cantidades suficientes para causar daño al consumidor, toda vez que *Salmonella* no debe estar presente en dichos alimentos y si es que ha habido contaminación por ésta y no ha sido eliminada del alimento al aplicar la CMI encontrada para este patógeno, la carne de porcino es de alto riesgo para la salud; asimismo a la CMI encontrada para *S. aureus* y aplicada en el sistema de estudio también se encuentra sobre el límite permitido para este microorganismo en carnes de porcino molida<sup>32</sup>.

Hay que observar también que las cantidades de extractos naturales adicionadas a cada uno de los sistemas pueden darse en valores mayores a las determinadas en el presente trabajo sin embargo podrían no ser recomendables ya que causarían cambios en las características organolépticas del producto, sin lograr de cualquier manera un incremento importante en la actividad antimicrobiana<sup>26</sup>.

## CONCLUSIONES

- Las CMI del aceite esencial de *Origanum vulgare* afectan la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi* A y *Staphylococcus aureus*.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* que suplementa a la carne molida de cerdo tiene efecto inhibitorio diferente en la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi* A.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* que suplementa a la carne molida de cerdo, afecta en mayor medida a *Staphylococcus aureus* y en menor medida a *Salmonella typhi*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. Intern J Food Microbiol 2001; 67: 187-195
2. Leite de Souza E, De Oliveira E, De Luna KR, Paiva C. Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. Braz Arch Biol Technol 2005; 48: 245-250.
3. Leite de Souza E, Montenegro TL, De Oliveira E. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. Braz J Microbiol 2006; 37(4): 151-7

4. Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. U.-Technol* 2004; 37: 263-268.
5. Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R. Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties- an Overview. *Forsch Komplementmed* 2009; 16: 79- 90.
6. Ravi S, Sita P, Janardhan K. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of leaf and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC. *World J Microbial Biotechnol* 2008; 24:1909-1914.
7. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and species. *J Med Microbiol* 2009; 58: 1454-1462
8. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *Intern J Food Microbiol* 2007; 115: 290-296
9. Ertas ON, Guler T, Ciftci M, Dalkilic B, Simsek UG. The effect of an essential oil mix derived from Oregano, Clove and Anise on broiler performance. *Intern J Poultry Sci* 2005; 4(11): 879-884.
10. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Microorganismos de los Alimentos*. España: Edit Acribia S.A.
11. Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB. *Microbiología de los alimentos*. 2da ed. España: Edit. Acribia, S.A. 2010.
12. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Microbiología moderna de los alimentos*. 5ta ed. España: Edit. Acribia, S.A. 2009.
13. Institute of Food Technologists. *Bacteria Associated with Foodborne Diseases*. Scientific Status Summary. 2004. [http://members.ift.org/NR/rdonlyres/3DEA7A91-DF48-42CE-B195-6B01C14E2\\_73\\_0/bacteria.pdf](http://members.ift.org/NR/rdonlyres/3DEA7A91-DF48-42CE-B195-6B01C14E2_73_0/bacteria.pdf).
14. Ifesan BOT, Hamtasin C, Mahabusarakam W, Voravuthikunchai SP. Inhibitory Effect of Eleutherine Americana Merr. Extract on *Staphylococcus aureus* isolated from food. *J Food Scie* 2009; 74(1): 76-81
15. Graham HD, Graham EJF. Inhibition of *Staphylococcus aureus* Growth and Heat-Stable Deoxyribonuclease Production by Garlic (*Allium sativum*). *Caribbean J Sci* 1998; 24(3-4): 95-101.
16. Larrañaga I, Carballo JM, Rodríguez M, Fernández J. *Control e Higiene de los Alimentos*. España: Edit Mc Graw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. 1999.
17. Vinent N. Riesgo de enfermedades transmisibles por alimentos en el combinado cárnico de la Empresa de Producción agropecuaria. *MEDISAN* 2004; 8(1): 12-20.
18. Albado E, Saez G, Grabiell S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) *Rev Med Hered* 2001; 12(1): 16-19.
19. Solís PN. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de Orégano (*Origanum vulgare* L.) y Tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como Potenciales Bioconservadores en Carne de Pollo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 2012.
20. Arcila CC, Loarca G, Lecona S, Gonzales E. El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. University of Illinois, Urbana-Champaign. [www.alanrevista.org/ediciones/2004-1/oregano](http://www.alanrevista.org/ediciones/2004-1/oregano) propiedades composición actividad biológica.asp
21. Bajpai VK, Rahman A, Dung NT, Huh MK, Kang SC. *In vitro* inhibition of Food Spoilage and Foodborne Pathogenic Bacteria by Essential Oil and Leaf Extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J Food Sci* 2008; 73(6): 78-83.
22. Caballero A, Carreño M, Cárdenas T, Grave O, Peraza P. Proceso de enseñanza-aprendizaje y utilización del sistema del análisis de peligros y puntos críticos de control en alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr* 2002; 16(1): 35-41.
23. Caballero A, Torres M. Efectos de la capacitación de los inspectores sobre el control de la temperatura de los alimentos. *Rev Cubana Sal Pública* 2004; 30(2): 45-54.
24. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, et al. Composition and antimicrobial Activity of Essential Oils from Aromatic Plants Used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35: 275-280.
25. Ardila MI, Vargas AF, Pérez JE, Mejía LF. Estudio preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud* 2009; 8: 121-126.
26. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE. Estudio de la Concentración Mínima Inhibitoria y modo de acción del aceite esencial de orégano y modo de acción del aceite esencial de orégano, thymol y carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 453-462
27. Helander I, Alakomi H, Latva-Kala K, Irene T, et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram Negative bacteria. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 3590-3595.
28. Nazia A, Sabhat S, Tariq P. Antibacterial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against gram negative bacilli. *Appl Environmen Microbiol* 2008; 74: 5986-5990.

29. Nevas M, Korhonen AR, Lindström M, Turkki P, Korkeala H. Antibacterial efficiency of Finnish Spice Essential Oils against Pathogenic and Spoilage Bacteria. *J Food Protection* 2004; 67(1): 199-202.
30. Casp A, Abril J. Tecnología de alimentos: Procesos de conservación de alimentos. 2da ed. España: Ediciones Mundi Prensa. 2003.
31. Ultee A, Bennis MHJ, Moezelaar R. The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(4): 1561.
32. MINSA/DIGESA. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú. 2008.